[Aus der experimentell-biologischen Abteilung (Prof. Dr. H. Sachs) des Königl. Institutes für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. (Direktor: Geheimer Obermedizinalrat Professor Dr. P. Ehrlich).]

Studien über das Verhalten hämolytischer Komplemente im salzfreien Medium.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

der

Hohen medizinischen Fakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität zu Heidelberg

vorgelegt von

Hans Guggenheimer
aus Berlin.

Jena,
Gustav Fischer.
1910.

[Aus der experimentell-biologischen Abteilung (Prof. Dr. H. Sachs) des Königl. Institutes für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. (Direktor: Geheimer Obermedizinalrat Professor Dr. P. Ehrlich).]

Studien über das Verhalten hämolytischer Komplemente im salzfreien Medium.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

der

Hohen medizinischen Fakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität zu Heidelberg

vorgelegt von

Hans Guggenheimer
aus Berlin.

Jena,
Gustav Fischer.
1910.

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg.

Referent: Prof. Dr. H. Kossel.
Dekan: Prof. Dr. Menge.

Abdruck aus der
Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie.
I. Teil. Originale. Bd. VIII.

Meiner Mutter.

Lange Zeit hat man sich beim Studium der Hämolysinwirkung darauf beschränkt, die Reaktionen in physiologischer (0,85-proz.) Kochsalzlösung vorzunehmen. Obwohl bereits von Buchner und Orthenberger[1]) Angaben über die Bedeutung der Salze für bakterizide Serumwirkungen vorlagen, wurden systematische Untersuchungen über die Wirkung der Serumhämolysine im salzfreien Medium erst von Ferrata[2]) in Morgenroths Laboratorium und gleichzeitig von Sachs und Teruuchi[3]) angestellt.

Ferrata fand in Uebereinstimmung mit den Buchnerschen Angaben, daß auch die hämolytische Serumwirkung bei fehlendem Salzgehalt aufgehoben ist. Es ließ sich leicht nachweisen, daß die Ambozeptorbindung an die Blutkörperchen in salzfreier Lösung nicht behindert ist, daß vielmehr das Ausbleiben der Hämolyse auf einer Unwirksamkeit der Komplemente beruht. Die Erklärung hierfür ergibt sich aus dem Verhalten des dialysierten Meerschweinchenserums. Es zeigte sich nämlich, daß sowohl der bei der Dialyse sich bildende Globulinniederschlag, wie der darüber befindliche Albuminanteil des Serums, durch Zentrifugieren isoliert, auch in salzhaltiger Lösung unwirksam ist, beide vereinigt dagegen die ursprüngliche Komplementwirkung wieder ausüben. Nach Brand[4]) wird von den beiden Komponenten der im Sediment befindliche Bestandteil an die ambozeptorbeladenen Blutkörperchen gebunden, und erst durch Vermittlung dieser Komponente gelangt die im Albuminanteil enthaltene zur Wirkung. Von der Anschauung ausgehend, daß die beiden Komponenten miteinander

---

1) H. Buchner und M. Orthenberger, Archiv f. Hygiene, 1890, Bd. 10. — H. Buchner, Archiv f. Hygiene, Bd. 17, 1893.

2) A. Ferrata, Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 13.

3) H. Sachs und Y. Teruuchi, Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 16, 17 und 19.

4) E. Brand, Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 34.

in analoger Weise reagieren wie Ambozeptor und Gesamtkomplement mit den Blutzellen, hat daher Brand den im Globulinniederschlag enthaltenen wirksamen Bestandteil als „Mittelstück", das wirksame Agens des Albuminanteils als „Endstück" bezeichnet, Ausdrücke, die auch im folgenden beibehalten werden sollen. Hecker[1]) zeigte dann, daß die Bindung des Mittelstücks schon bei 0° erfolgt, während die Wirkung des Endstücks nur bei höherer Temperatur eintritt. Wird das Mittelstück in Kochsalzlösung aufbewahrt, so erfährt es, wie Brand zuerst beobachtete, eine eigenartige Alteration. Es verliert nämlich die Fähigkeit, bei gleichzeitigem Endstückzusatz zu wirken. Eine Zerstörung des Mittelstücks hat dabei aber nicht stattgefunden, denn wird in Kochsalzlösung aufbewahrtes Mittelstück („Kochsalzmittelstück") vorher an die ambozeptorbeladene Blutzelle gebunden, so tritt bei nachträglichem Endstückzusatz Hämolyse ein.

Von dieser im salzfreien Medium eintretenden reversiblen Inaktivierung — bedingt durch die Spaltung des Komplements — streng zu sondern ist jene von Sachs und Teruuchi beschriebene irreversible Schädigung des Komplements. Diese dauernde Inaktivierung hat ein Optimum entsprechend einer 9—10-fachen Wasserverdünnung des Meerschweinchenserums. Bei stärkerer Verdünnung (20—40-fach) bleibt dieselbe aus. Abhängig ist diese Zerstörung des Komplements von den besonderen Eigenschaften des Meerschweinchenserums. Verwendet man längere Zeit gelagertes Serum, oder wird die Verdünnung mit Wasser bei 0—9° vorgenommen oder das frisch gewonnene Serum vor dem Verdünnen 10—15 Minuten auf 51° erhitzt, so tritt die Inaktivierung nicht ein.

War nun auch die Tatsache der Trennung von Mittelstück und Endstück im salzfreien Medium einwandfrei erwiesen, so konnte man doch das Verhalten des Komplements in seiner Beziehung zu den ambozeptorbeladenen Blutkörperchen durchaus nicht hinreichend beurteilen. Denn die Komplementzerstörung ist, wie bereits erwähnt, von bestimmten Faktoren abhängig, die, wenn wir von dem Einfluß des Alters des Serums absehen, besonders in den Verdünnungsgraden gelegen sind. Bei hämolytischen Versuchen sind nun die Bedingungen sehr leicht derart zu gestalten und meist sogar von vornherein so gestaltet, daß eine 20—40-fache oder stärkere Verdünnung des Meerschweinchenserums resultiert. Digeriert man derart verdünntes Serum mit ambozeptorbeladenen Blutzellen, so tritt keine Hämolyse ein, jedoch werden die Blutkörperchen bei nachträglichem Besalzen, wie dies Sachs und Teruuchi[2])

1) R. Hecker, Arbeiten aus dem Königl. Institut f. exper. Therapie zu Frankfurt a. M., Heft 3, Jena 1907.

2) l. c.

bereits gezeigt haben, gelöst. Eine Zerstörung der Komplementwirkung findet also unter geeignet gewählten Verhältnissen nicht statt. Wenn man nun annimmt, daß auch bei der stärkeren Verdünnung im salzfreien Medium das Komplement in die beiden Komponenten gespalten wird, so ergibt sich die Frage, ob dabei das isolierte und, wie das nachträgliche Besalzen ja zeigt, aktionsfähig bleibende Mittelstück mit der ambozeptorbeladenen Blutzelle reagiert, oder ob das salzfreie Medium diese Bindung zu verhindern imstande ist. Von vornherein mußte die Annahme naheliegend erscheinen, daß hier ähnliche Verhältnisse vorliegen könnten wie bei den Beziehungen der ambozeptorbeladenen Blutzelle zum Komplement bei niedriger Temperatur [Ehrlich und Morgenroth[1]), Sachs und Bolkowska[2]), Haendel[3])] oder bei geigneter saurer Reaktion durch ein Phosphatgemisch [Michaelis und Skwirsky[4])].

So einfach die Beantwortung der gestellten Frage erscheinen konnte, so schwierig gestalteten sich doch die Verhältnisse bei der näheren Analyse der in Betracht kommenden Phänomene. Die Ursachen hierfür sind einerseits in der besonderen Beschaffenheit der erforderlichen Blutaufschwemmungen in Rohrzuckerlösung gelegen (Agglutination), andererseits in dem Umstande, daß eine gewisse Zerstörung des Komplements bei dem Aufenthalt in Rohrzuckerlösung doch nicht immer zu vermeiden war. Außerdem ließ die durch das nachträgliche Besalzen der Rohrzuckerlösung entstehende Hypertonie des Mediums oft nicht mehr die volle Komplementwirkung in Erscheinung treten. Schließlich zeigten die Blutaufschwemmungen in Rohrzuckerlösung, je nach der Art ihrer Herstellung, neue unerwartete Eigenschaften, die eine weitere Komplikation für die Lösung des Problems bedeuteten.

---

1) P. Ehrlich und J. Morgenroth, Berliner klin. Wochenschrift, 1899—1900.

2) H. Sachs und Bolkowska, Zeitschrift f. Immunitätsforschung, Bd. 7, 1910, p. 778.

3) Haendel, Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt, Bd. 28, 1908, p. 523.

4) L. Michaelis und P. Skwirsky, Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Bd. 4, 1909, Heft 3.

Bevor ich auf die eigentlichen Untersuchungen näher eingehe, sei es gestattet, die Technik und Methodik, der im allgemeinen gefolgt wurde, kurz zu schildern.

I. Allgemeine Technik und Methodik.

Wir benutzten zu allen Versuchen Hammelblutaufschwemmungen, die derart hergestellt wurden, daß das Blut mit reichlichen Mengen der Suspensionsflüssigkeit 2mal gewaschen und in 6—8-proz. Suspension aufgeschwemmt wurde. In den einzelnen Versuchsröhrchen kam je 1 ccm der Blutaufschwemmung zur Anwendung. Als Ambozeptor verwendeten wir das inaktivierte Serum eines mit Hammelblut vorbehandelten Kaninchens, von welchem 0,0005 ccm genügten, um die oben erwähnte Blutmenge (1 ccm) unter Mitwirkung von 0,1 ccm Meerschweinchenserum komplett zu lösen. Bei zahlreichen Versuchen wurde ambozeptorbeladenes (sensibilisiertes) Blut verwandt, das in der Weise hergestellt wurde, daß eine gewisse Menge der Hammelblutaufschwemmung mit gleichen Teilen Suspensionsflüssigkeit, welche die entsprechende Ambozeptormenge enthielt, 1 Stunde bei 37° digeriert wurde. Dann wurde abzentrifugiert, das Sediment 2mal gewaschen und auf das ursprüngliche Volumen wieder aufgefüllt.

Als Komplement diente stets Meerschweinchenserum.

Die beiden Komponenten (Mittelstück und Endstück) wurden für die vorliegenden Versuche durchwegs nach der von Ferrata angegebenen Methode durch Dialyse — 16—20 Stunden gegen fließendes Wasser — gewonnen. In den einzelnen Versuchsröhrchen wurden überall gleiche Volumina hergestellt; die Versuchsreihen blieben 2 Stunden im Brutschrank bei 37°, dann über Nacht im Eisschrank und wurden in der Regel erst am nächsten Morgen beurteilt.

II. Ueber die Darstellung von Blutaufschwemmungen in isotonischer (7,8-proz.) Rohrzuckerlösung.

Einer allgemeinen Erfahrung entsprechend, bereitet das Arbeiten mit Blutaufschwemmungen in Rohrzuckerlösung insofern Schwierigkeiten, als sich derartige Blutsuspensionen mehr oder weniger stark agglutiniert erweisen und zur Deglutination ein mindestens 24-stündiges Lagern erforderlich ist, was aber auch nicht immer zu dem gewünschten Erfolg führt. Die früheren Erfahrungen des hiesigen Laboratoriums [cf. Sachs und Teruuchi[1])] beziehen sich allerdings auf Rinderblut, das vom Schlachthof stammte. Dagegen wurden meine

1) l. c.

Versuche mit Hammelblut ausgeführt, das den im Instituts-stall eingestellten Hammeln entnommen wurde.

Die Rohrzuckerblutaufschwemmung wurde nun zunächst derart bereitet, daß das defibrinierte Blut direkt mit 7,8-proz. Rohrzuckerlösung verdünnt und dann noch 2mal mit 7,8-proz. Rohrzuckerlösung gewaschen wurde („direktes Rohrzuckerblut"). Hierbei trat in der Regel eine Agglutination nicht ein.

Als es aber zu einem Teil der Untersuchungen erforderlich wurde, die Blutaufschwemmung durch Ueberführen von Blutkörperchensuspensionen aus Kochsalzlösung in Rohrzuckerlösung herzustellen („Kochsalz-Rohrzuckerblut"), ergab sich in den meisten Fällen, daß dabei eine mehr oder minder starke Agglutination wahrzunehmen ist.

Es lagen also hier analoge Verhältnisse vor, wie sie kürzlich von J. Bang[1]) für das Kalbsblut beschrieben wurden. Das Ochsenblut hingegen agglutiniert nach Bang, was auch mit den früheren Erfahrungen der Autoren übereinstimmt, beim direkten Verdünnen mit Rohrzuckerlösung.

Zur Erklärung dieses differenten Verhaltens von Kalbs- und Ochsenblut hat Bang auf den verschiedenen Kohlensäuregehalt des Blutes hingewiesen, der ja nach dessen Herkunft aus Arterien oder Venen variieren mußte. Obwohl das von mir benutzte Hammelblut der Herkunft nach venöses war (aus der Vena jugularis entnommen), dürften doch auch hier die gleichen Beziehungen zwischen Kohlensäuregehalt und Agglutination, wie sie Bang annimmt, zu berücksichtigen sein. Mehrmals stellte sich nämlich auch bei dem „direkten Rohrzuckerblut" Agglutination ein, der allerdings meist ziemlich rasch eine Deglutination folgte, zuweilen machte sich aber auch eine starke Agglutination störend bemerkbar. Diese lernten wir dadurch vermeiden, daß wir die Defibrinierung unter reichlichem Luftzutritt vornehmen. Von solchem „arterialisiertem" Blut ausgehend konnte niemals eine nennenswerte Agglutination des „direkten Rohrzuckerblutes" beobachtet werden.

---

1) J. Bang, Biochem. Zeitschr., Bd. 16, 1909, p. 255.

In den vorliegenden Untersuchungen erwies sich dieser Umstand von großer Wichtigkeit, da es durch reichliches Digerieren des Blutes mit Luft vor dem Verdünnen mit Rohrzuckerlösung fast mit Sicherheit gelang, sofort gebrauchsfähige Hammelblutaufschwemmungen in Rohrzuckerlösung zu erhalten. Auch bei dem „Kochsalz-Rohrzuckerblut" konnte durch das vorherige Arterialisieren des Blutes die Agglutination so sehr reduziert werden, daß ein Hindernis für seine sofortige Verwendung in der Regel nicht mehr bestand [1]).

Zur Vermeidung der Agglutination empfiehlt es sich ferner, nicht das von Serum befreite Blut zu verwenden, sondern das native serumhaltige Blut direkt mit Rohrzuckerlösung zu verdünnen. Im ersteren Falle tritt nämlich in der Regel auch dann Agglutination ein, wenn sie im letzteren ausbleibt. Auf eine Schutzwirkung von gelösten Serumbestandteilen kann man diese Differenz schwerlich beziehen, da das serumfreie Blut bereits nach dem ersten Auswaschen mit Rohrzuckerlösung Agglutination zeigte, während eine solche auch bei dem 2mal mit Rohrzuckerlösung gewaschenen serumhaltigen Blut noch nicht wahrzunehmen war. Vielleicht kommen daher außer dem Kohlensäuregehalt des Blutes noch andere Momente in Betracht. So könnte man zu der Annahme neigen, daß in dem salzfreien Milieu Bestandteile des Serums mit den Blutkörperchen sedimentieren, wofür die später mitzuteilenden Untersuchungen einen Anhaltspunkt darbieten.

Für das Hammelblut ergibt sich jedenfalls nach unseren Erfahrungen, daß man am zweckmäßigsten in der Weise verfährt, das frisch gewonnene Blut unter möglichst reichlichem Luftzutritt zu defibrinieren und sodann direkt mit der Rohrzuckerlösung zu verdünnen und auszuwaschen.

---

1) Einige Versuche wurden auch mit Rinderblut vorgenommen. Dabei zeigte die „direkte" Rohrzuckerblutaufschwemmung stets starke Agglutination, während die entsprechende „Kochsalz-Rohrzuckerblutaufschwemmung" in vielen Fällen eine erheblich geringere oder gar keine Agglutination aufwies. Die Versuche sind jedoch nicht zahlreich genug durchgeführt, um einen Schluß darüber zu gestatten, ob etwa noch restierende Kochsalzspuren, die Agglutination hemmend, interferierten, oder ob hier besondere Bedingungen vorliegen.

III. Ueber die Beziehungen des Komplements zu ambozeptorbeladenen Blutzellen in Rohrzuckerlösung.

Daß das Komplement als solches in Rohrzuckerlösung von den ambozeptorbeladenen Blutkörperchen nicht gebunden wird, war von vornherein anzunehmen, da ja im salzfreien Medium die Spaltung in die beiden Komponenten erfolgt. Jedoch dürften beweiskräftige Untersuchungen nicht hinreichend vorliegen. Nur eine Angabe ist mir bekannt, die von v. Eisler[1]) stammt und dafür spricht, daß Komplement nach dem Digerieren mit Ambozeptor und Blut in Rohrzuckerlösung noch im Abguß nachgewiesen werden kann. Es handelt sich aber in diesem Versuch offenbar um eine sehr kleine Ambozeptordosis, so daß die Folgerung, daß auch bei hinreichend stark sensibilisiertem Blut eine Bindung des Komplements in Rohrzuckerlösung ausbleibt, nicht berechtigt erscheint.

Ich habe daher eine Reihe von Untersuchungen mit verschiedengradig sensibilisiertem Blut (bis 100 Ambozeptoreinheiten) vorgenommen und dabei trotz mannigfacher Variation der Komplementdosen stets gefunden, daß sich die mit Meerschweinchenserum in Rohrzuckerlösung digerierten ambozeptorbeladenen Blutkörperchen nach dem Zentrifugieren und Ueberführen der Sedimente in physiologische Kochsalzlösung nicht lösen. Da wir andererseits wissen, daß eine Zerstörung des Komplements unter geeigneten Verhältnissen im salzfreien Medium vermieden werden kann — und besondere Kontrollversuche bestätigten dies aufs neue — so ergibt sich, daß auch trotz hochgradiger Sensibilisierung eine Bindung des gesamten Komplements im salzfreien Medium unterbleibt.

Um nun die Frage zu entscheiden, ob die eine Komponente des Komplements, das Mittelstück, von der ambozeptorbeladenen Blutzelle gebunden wird, kamen im wesentlichen 3 Verfahren in Betracht:

1) Man konnte nach dem zuerst von Ehrlich und Morgenroth[2]) bei der sogenannten Kältetrennungsmethode angewandten Prinzip vorgehen, indem man ambozeptorbe-

1) v. Eisler, Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Bd. 2, 1909, p. 159.
2) l. c.

ladenes Blut mit Komplement digeriert und nach dem Zentrifugieren Sediment und Abguß einerseits auf Komplementwirkung prüft, andererseits gegenseitig aufeinander einwirken läßt. Bei einer Trennung müßten sich die ersten beiden unwirksam erweisen, während beim Mischen beider Hämolyse zu erwarten ist. Mit dieser Methode ist in der Tat Sachs und Bolkowska[1]) der Nachweis gelungen, daß im salzhaltigen Medium in der Kälte eine Trennung zwischen Mittelstück und Endstück bei hinreichend stark sensibilisiertem Blut eintritt, während bei schwachen Ambozeptordosen beide Komplementkomponenten im Sinne von Ehrlich und Morgenroth der Bindung entgehen.

2) Der zweite Weg bestand darin, daß man die Abgüsse von verdünntem Meerschweinchenserum, das in Rohrzuckerlösung auf ambozeptorbeladenes Blut eingewirkt hatte, einerseits auf sensibilisierte Blutkörperchen einwirken ließ, andererseits auf Blutkörperchen, die außer mit dem Ambozeptor auch mit dem Mittelstück beladen waren, und die im folgenden nach der Benennung von Michaelis und Skwirsky[2]) als „persensibilisiert" bezeichnet werden sollen. Erstere stellen naturgemäß ein Reagens auf Komplement dar, letztere auf freies Endstück. Bei einer isolierten Bindung des Mittelstücks in Rohrzuckerlösung dürften also nur letztere gelöst werden.

3) Die dritte Methode besteht darin, daß man wiederum ambozeptorbeladenes Blut mit Meerschweinchenserum in Rohrzuckerlösung digeriert und die gewaschenen Sedimente mittels Zusatz von Endstück darauf prüft, ob sie nur sensibilisiert oder im Sinne einer Bindung des Mittelstücks persensibilisiert sind.

Die drei geschilderten Verfahren sind von mir in zahlreichen Versuchsreihen ausgeführt worden. Die Beweiskraft der Ergebnisse wurde aber dadurch beeinträchtigt, daß sich durch fortgesetzte Kontrollversuche zeigte, daß die Annahme einer prinzipiellen Gleichartigkeit von Blutaufschwemmungen in Kochsalz- und Rohrzuckerlösung sich nicht als richtig

1) l. c.
2) l. c.

erwies. Da das Verständnis der hier vorliegenden Differenzen für die Beurteilung der Versuchsergebnisse von wesentlicher Bedeutung ist, so möchte ich mir erlauben, zunächst das Verhalten des in Rohrzuckerlösung mit Ambozeptor beladenen Rohrzuckerblutes zu schildern.

IV. Ueber das Verhalten des in Rohrzuckerlösung mit Ambozeptor beladenen Blutes.

Anläßlich von Versuchen, die wir zur Beurteilung der Beziehungen des Komplements zur ambozeptorbeladenen Blutzelle in Rohrzuckerlösung nach der oben bereits kurz angeführten 3. Methode anstellten, wurden wir zuerst auf ein differentes Verhalten der sensibilisierten Rohrzuckerblutaufschwemmungen aufmerksam. Wurde sensibilisiertes Rohrzuckerblut 1 Stunde mit Meerschweinchenserum digeriert, so mußten, falls dabei ein Teil des Komplements, das Mittelstück, gebunden wird, die in Kochsalzlösung übergeführten Blutsedimente durch Zusatz von Endstück gelöst werden. Als Kontrollreihe prüften wir die Wirksamkeit des Endstücks auf ambozeptorbeladenes Rohrzuckerblut ohne vorheriges Digerieren mit Meerschweinchenserum. Wir mußten natürlich erwarten, daß dabei jegliche Hämolyse ausbleibe. Diese Annahme erwies sich aber nur für das Kochsalz-Rohrzuckerblut für richtig, das „direkte“ Rohrzuckerblut wurde auffallenderweise nach dem Sensibilisieren bereits durch Endstück allein gelöst.

Zur Demonstration dieser Tatsache sei folgendes Versuchsbeispiel angeführt:

Je 1 ccm verschieden hergestellter Blutaufschwemmungen wurde mit absteigenden Mengen Ambozeptor 1 Stunde bei 37° digeriert.

Reihe A: gewöhnliche Aufschwemmung in Kochsalzlösung; in Kochsalzlösung sensibilisiert.

Reihe B: „Kochsalz-Rohrzuckerblut“
Reihe C: „direktes Rohrzuckerblut“ } in Rohrzucker sensibilisiert.

Die durch Zentrifugieren erhaltenen Sedimente wurden in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und in Kochsalzlösung unter Zusatz von je 0,1 ccm Endstück aufgeschwemmt.

Das Resultat zeigt Tabelle I.

Tabelle I.

Menge des zum Sensibilisieren benutzten Ambozeptors ccm	Hämolyse von 1 ccm mit absteigenden Ambozeptormengen sensibilisierter Blutaufschwemmung durch 0,1 ccm Endstück		
	A Kochsalzblut	B „Kochsalz-Rohrzuckerblut“	C „direktes Rohrzuckerblut“
0,05	wenig	wenig	komplett
0,025	Spur	Spur	„
0,015	0	0	„
0,01	0	0	„
0,005	0	0	„
0,0025	0	0	fast komplett
0,0015	0	0	stark
0	0	0	0

Aus der Tabelle ergibt sich zunächst, daß das Endstück für die in gewöhnlicher Weise sensibilisierten Kochsalzblutkörperchen an und für sich unwirksam ist. Nur bei den größten Ambozeptordosen ist eine geringfügige hämolytische Wirkung wahrzunehmen, was der allgemeinen Erfahrung entspricht, daß eine ideale Trennung der beiden Komponenten bei der Dialyse wohl nur äußerst selten glückt. Für die hier interessierenden Fragen ist diese nur bei starker Sensibilisierung eintretende Hämolyse jedoch ohne Belang, da die Tabelle zeigt, daß das Endstück noch bei 30 Ambozeptoreinheiten jeglicher hämolytischen Kraft entbehrt und selbst bei 50 Ambozeptoreinheiten nur in minimaler Weise wirkt. Bei der Sensibilisierung des aus einer Kochsalzaufschwemmung hergestellten Rohrzuckerbluts (Reihe B) zeigt sich kein Unterschied. Die beiden Reihen A und B stimmen vollkommen überein, dagegen mußte das differente Verhalten des von vornherein in Rohrzuckerlösung hergestellten und dann in Rohrzuckerlösung sensibilisierten „direkten Rohrzuckerbluts“ im höchsten Maße auffällig erscheinen. Denn aus der Reihe C ergibt sich die unerwartete Tatsache, daß das Endstück scheinbar wie das Gesamtkomplement wirkt und die mit 10 AE. sensibilisierten Blutkörperchen noch komplett, die mit 3 AE. beladenen stark löst.

Man konnte zunächst daran denken, daß diese stark lösende Kraft des Endstücks auf sensibilisiertes „direktes“ Rohrzuckerblut auf einer gesteigerten Empfindlichkeit des sensibilisierten Rohrzuckerbluts beruhe, und daß demnach noch geringe Mengen wirksamen Komplements in dem als „Endstück“ bezeichneten Dialysatabguß vorhanden sind, die zwar auf das sensibilisierte Kochsalzblut nicht wirken, aber für das vielleicht empfindlichere sensibilisierte Rohrzuckerblut noch hinreichen. Es erschien daher angezeigt, einerseits die Wirkung des Endstücks, andererseits die komplementäre Kraft des Meerschweinchenserums auf sensibilisiertes Kochsalzblut und sensibilisiertes Rohrzuckerblut zu vergleichen. Ich verfuhr daher folgendermaßen:

Die zur Anwendung gelangenden Blutaufschwemmungen wurden mit 0,015 Ambozeptor (ca. 30 lösende Dosen) sensibilisiert.

a) Kochsalzblutaufschwemmung in Kochsalzlösung sensibilisiert.
b) Direktes Rohrzuckerblut in Rohrzuckerlösung sensibilisiert.

Je 1 ccm dieser Suspensionen, die nach dem Sensibilisieren mit Kochsalzlösung gewaschen und in Kochsalzlösung aufgeschwemmt waren, wurden
in der Reihe A mit absteigenden Dosen Endstück,
in der Reihe B mit absteigenden Dosen Komplement versetzt.

Das resultierende Ergebnis ist in Tabelle II verzeichnet.

Tabelle II.

Menge des Endstücks resp. Komplements ccm	Hämolyse von 1 ccm mit 0,015 ccm Ambozeptor sensibilisierter Blutaufschwemmung durch absteigende Mengen			
	A Endstück		B Komplement	
	a) Kochsalzblut	b) Rohrzuckerblut	a) Kochsalzblut	b) Rohrzuckerblut
0,1	Spur	komplett	komplett	komplett
0,05	Spürchen	„	„	„
0,025	0	fast komplett	fast komplett	„
0,015	0	mäßig	stark	fast komplett
0,01	0	wenig	mäßig	mäßig
0,005	0	0	0	Spur
0	0	0	0	0

Aus der Tabelle II ergibt sich zunächst eine Bestätigung der Wirksamkeit des Endstücks für sensibilisiertes „direktes“

Rohrzuckerblut. Die zur völligen Hämolyse ausreichenden Endstückmengen entsprechen genau den Dosen des Gesamtkomplements, die zur kompletten Auflösung des sensibilisierten Kochsalzblutes benötigt werden. Das sensibilisierte Rohrzuckerblut wird zwar noch durch etwas kleinere Komplementmengen komplett gelöst als das entsprechende Kochsalzblut, doch ist diese Differenz in Anbetracht des so großen Unterschieds der beiden Blutarten in der Empfindlichkeit gegen Endstück eine so geringfügige, daß es nicht angeht, das verschiedene Verhalten der beiden Blutarten gegen Endstück allein auf eine größere Empfindlichkeit des sensibilisierten Rohrzuckerbluts gegenüber den im Endstückanteil noch enthaltenen Spuren des Gesamtkomplements zurückzuführen.

Da mithin also ein prinzipiell verschiedenartiges Verhalten des „direkten" Rohrzuckerblutes von dem Kochsalzblut festgestellt war, erschien es zunächst wünschenswert, die Bedeutung der Sensibilisierungsart für das Auftreten dieser Differenz zu ergründen. Es handelte sich vornehmlich um die Entscheidung der Frage, ob das sensibilisierte Rohrzuckerblut nur dann empfindlich gegenüber Endstück ist, wenn die Sensibilisierung in Rohrzuckerlösung vorgenommen wird, oder auch bei Sensibilisierung des „direkten" Rohrzuckerbluts in physiologischer Kochsalzlösung.

Zur Entscheidung dieser Frage wurde folgendermaßen verfahren:

Es wurden mit absteigenden Ambozeptormengen vorbehandelt in

Reihe A: gewöhnliche Blutaufschwemmung in Kochsalzlösung (je 1 ccm);

Reihe B: „direktes" Rohrzuckerblut vor dem Gebrauch abzentrifugiert und in Kochsalzlösung übergeführt („Rohrzucker-Kochsalzblut") (je 1 ccm);

Reihe C: „direktes" Rohrzuckerblut (je 1 ccm).

Blut A und B wurden in Kochsalzlösung sensibilisiert, Blut C wurde in Rohrzuckerlösung sensibilisiert, danach zentrifugiert und die Sedimente aller 3 Reihen mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und unter Zusatz von je 0,1 ccm Endstück in Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

Tabelle III.

Menge des zum Sensibilisieren benutzten Ambozeptors ccm	Hämolyse von 1 ccm mit absteigenden Ambozeptormengen sensibilisierten Blutes durch 0,1 ccm Endstück		
	A Kochsalzblut	B „Rohrzucker-Kochsalzblut“	C „direktes“ Rohrzuckerblut
0,05	fast komplett	stark	fast komplett
0,025	0	wenig	komplett
0,01	0	„	„
0,005	0	mäßig	„
0,0025	0	fast komplett	fast komplett
0,0015	0	mäßig	„ „
0,001	0	„	stark
0,0005	0	Spur	mäßig
0,00025	0	„	wenig
0	0	0	0

Aus der Tabelle III ergibt sich, daß die Empfindlichkeit gegenüber Endstück auch nach dem Sensibilisieren des Rohrzuckerbluts in physiologischer Kochsalzlösung in Erscheinung tritt. Jedoch ist ein Unterschied gegenüber dem Verhalten des auch in Rohrzuckerlösung sensibilisierten Rohrzuckerbluts insofern zu bemerken, als die Reihe B ein Optimum der hämolytischen Wirkung bei der Sensibilisierung mit mittleren Ambozeptordosen aufweist, während bei größeren Ambozeptordosen die Hämolyse geringer wird [1]).

Auf die Möglichkeiten der Erklärung für diese wiederholt beobachtete eigentümliche Erscheinung soll später eingegangen werden. Jedenfalls ergab sich zunächst die weitere Frage, ob nicht die Abschwächung der Empfindlichkeit nach dem Sensibilisieren in Kochsalzlösung durch eine Schädigung der dem Rohrzuckerblut zukommenden Eigenschaften durch Kochsalzlösung bedingt sei. In dem beschriebenen Versuch war das Rohrzuckerblut direkt in Kochsalzlösung übergeführt, ohne daß die Blutkörperchen vorher mit Kochsalzlösung gewaschen

1) Die Zunahme der hämolytischen Wirkung bei größten Ambozeptordosen ist auch bei Verwendung des gewöhnlichen Kochsalzblutes (Reihe A) wahrzunehmen und dürfte auch hier darin ihre Erklärung finden, daß der als Endstück fungierende Albuminanteil des Dialysates noch geringe Mengen des Mittelstücks enthält, welche bei stärkster Sensibilisierung gerade zu einer Hämolyse ausreichen.

waren. Es mußte daher festzustellen von Interesse erscheinen, ob eine Verminderung der Empfindlichkeit durch ein weiteres Waschen des Rohrzuckerbluts mit physiologischer Kochsalzlösung vor dem Sensibilisieren erzielt wird.

In dem folgenden Versuch, welcher der Beantwortung dieser Frage diente, erwies sich das in Rohrzuckerlösung sensibilisierte Rohrzuckerblut von einer ganz besonders starken Empfindlichkeit gegenüber dem Endstück.

Es wurden mit absteigenden Ambozeptormengen sensibilisiert:

Reihe A: „direktes“ Rohrzuckerblut (in Rohrzuckerlösung sensibilisiert).

Reihe B: „Rohrzucker-Kochsalzblut“ vor der Verwendung in Kochsalzlösung übergeführt.

Reihe C: „Rohrzucker-Kochsalzblut“, wie Blut B aus „direktem“ Rohrzuckerblut in Kochsalzlösung übergeführt, die Kochsalzlösung aber wieder abzentrifugiert und durch frische Kochsalzlösung ersetzt.

Reihe B und C in Kochsalzlösung sensibilisiert. Je 1 ccm dieser Blutaufschwemmungen wurden mit 0,04 ccm Endstück versetzt.

Tabelle IV.

Menge des zur Sensibilisierung benutzten Ambozeptors ccm	Hämolyse von 1 ccm der mit absteigenden Ambozeptormengen sensibilisierten Blutaufschwemmungen durch 0,04 ccm Endstück		
	A „direktes“ Rohrzuckerblut	B „Rohrzucker-Kochsalzblut“ (nicht gewaschen)	C „Rohrzucker-Kochsalzblut“ (gewaschen)
0,05	komplett	fast komplett	fast komplett
0,025	„	stark	stark
0,015	„	mäßig	mäßig
0,01	„	wenig	wenig
0,005	„	mäßig	„
0,0025	„	„	Spur
0,0015	„	stark	„
0,001	„	fast komplett	„
0,0005	fast komplett	wenig	„
0	0	0	0

Aus der Tabelle IV ergibt sich zunächst in Bestätigung der Tabelle III, daß durch das Sensibilisieren des Rohrzuckerbluts in Kochsalzlösung (Reihe B) die Empfindlichkeit gegenüber dem Endstück vermindert wird, wobei wiederum die eigentümliche Unregelmäßigkeit der Reihe in Erscheinung

tritt. Aus Reihe C ist aber ersichtlich, daß es bereits durch einmaliges Auswaschen mit physiologischer Kochsalzlösung gelingt, die Empfindlichkeit des Rohrzuckerblutes erheblich weiter zu reduzieren, und daß dabei die paradoxe Erscheinung der unregelmäßigen Reihe nicht mehr zu beobachten ist. Da man annehmen darf, daß bei weiterem Waschen eine noch wesentlichere Verminderung eintritt, so dürfte der Schluß berechtigt erscheinen, daß das Rohrzuckerblut durch gründliches Behandeln mit physiologischer Kochsalzlösung die ihm eigentümliche Qualität wieder einbüßt. Jedenfalls hat sich gezeigt, daß das hier behandelte Phänomen in prägnantester Weise dann zur Beobachtung gelangt, wenn das „direkte" Rohrzuckerblut auch in Rohrzuckerlösung sensibilisiert und erst nach dem Sensibilisieren in physiologische Kochsalzlösung übergeführt wird.

Als einfachste Erklärung für diese Eigentümlichkeit des Rohrzuckerbluts, das ja nach dem Sensibilisieren gleichsam persensibiliert erscheint, mußte die Annahme imponieren, daß das „direkte" Rohrzuckerblut bereits an und für sich die eine Komponente des Komplements, das Mittelstück, enthält.

Wenn dem so ist, dann mußte sich aber dasselbe in dem Rohrzuckerblut in der üblichen Weise nachweisen lassen.

Ich ging daher in der Weise vor, daß ich lackfarbene Blutlösungen herstellte und dieselben auf in gewöhnlicher Art in physiologischer Kochsalzlösung sensibilisiertes Blut bei Zusatz von Endstück prüfte. Naturgemäß mußten dabei die lackfarbenen Lösungen von Kochsalzblut und Rohrzuckerblut miteinander verglichen werden.

Es wurde demnach folgendermaßen verfahren.

Durch Zentrifugieren wurden gewonnen die Sedimente
I von 10 ccm Kochsalzblutaufschwemmung,
II von 10 ccm „direkter" Rohrzuckerblutaufschwemmung.

Die Sedimente wurden durch Zufügen von 9,2 ccm Aqu. dest. lackfarben gemacht und mit 0,8 ccm 10-proz. Kochsalzlösung besalzen. Zu je 1 ccm sensibilisierter Blutaufschwemmung (0,01 ccm Ambozeptor) wurden absteigende Mengen der lackfarbenen Blutlösungen zugefügt, und zwar in
Reihe A: lackfarbenes Kochsalzblut + 0,1 ccm Endstück,
Reihe B: lackfarbenes Rohrzuckerblut + 0,1 ccm Endstück,
Reihe C: lackfarbenes Rohrzuckerblut ohne Endstückzusatz.

Tabelle V.

Menge der lackfarbenen Blutlösung ccm	Hämolyse von 1 ccm mit 0,01 ccm Ambozeptor sensibilisierter Blutaufschwemmung durch absteigende Mengen lackfarbener Blutlösung		
	A aus Kochsalzblut + 0,1 ccm Endstück	B aus Rohrzuckerblut + 0,1 ccm Endstück	C aus Rohrzuckerblut (ohne Endstück)
1,0	0	komplett	0
0,5	0	„	0
0,25	0	„	0
0,15	0	„	0
0,1	0	„	0
0,05	0	fast komplett	0
0,025	0	mäßig	0
0	0	0	0

Wie aus Tabelle V ersichtlich, erwies sich die Erwartung, von der wir ausgingen, allem Anschein nach als bestätigt. Während die lackfarbene Lösung aus Kochsalzblut sich als vollkommen indifferent erwies, entsprach die Wirkung der aus dem „direkten“ Rohrzuckerblut dargestellten lackfarbenen Lösung vollkommen der des Mittelstücks. Daß diese lackfarbene Lösung nicht etwa an und für sich hämolytisch wirkt, zeigt Reihe C der Tabelle V, in der die Prüfung ohne Endstückzusatz erfolgte.

Um auch die in der lackfarbenen Blutlösung enthaltene Substanz auf ihr sonstiges Verhalten im Vergleich zu der durch Dialyse gewonnenen Mittelstückkomponente zu prüfen, wurde auch die Feststellung der Resistenz gegenüber thermischen Einflüssen angeschlossen. Damit wurde eine Analyse lackfarbener Blutlösungen, die aus „Kochsalz-Rohrzuckerblut“ hergestellt waren, vereinigt.

Absteigende Mengen lackfarbener Blutlösungen (10 Proz. Blut enthaltend) wurden mit je 0,05 ccm Endstück und je 1 ccm sensibilisierten (0,01 Ambozeptor) Kochsalzblutes digeriert.

Die lackfarbenen Blutlösungen waren bereitet in
Reihe A: aus „direktem“ Rohrzuckerblut,
Reihe B: aus „direktem“ Rohrzuckerblut und $^1/_2{}^h$ auf 55° erhitzt,
Reihe C: aus „direktem“ Rohrzuckerblut und $^1/_2{}^h$ auf 60° erhitzt,
Reihe D: aus Kochsalz-Rohrzuckerblut.

Das Ergebnis zeigt Tabelle VI.

Tabelle VI.

Menge der lackfarbenen Blutlösungen	Hämolyse von 1 ccm mit 0,01 ccm Ambozeptor sensibilisiertem Blut durch 0,05 ccm Endstück und absteigende Dosen lackfarbener Blutlösung			
	aus „direktem“ Rohrzuckerblut			aus „Kochsalz-Rohrzuckerblut“
ccm	A (nicht erhitzt)	B $^1/_2{}^h$ 55°	C $^1/_2{}^h$ 60°	D (nicht erhitzt)
1,0	komplett	komplett	0	0
0,5	„	„	0	0
0,25	„	fast komplett	0	0
0,15	„	stark	0	0
0,1	„	mäßig	0	0
0,05	„	wenig	0	0
0,025	stark	Spur	0	0
0,015	mäßig	Spürchen	0	0
0,01	wenig	„	0	0
0	0	0	0	0

Aus der Tabelle VI ergibt sich, daß durch ein halbstündiges Erhitzen der lackfarbenen Blutlösung auf 55° die Mittelstückwirkung abgeschwächt wird. Zwar ist die Inaktivierung bei 55° noch keine vollkommene, beim Erhitzen auf 60° tritt dagegen eine gänzliche Unwirksamkeit ein. Insofern besteht also ein Unterschied zu dem Verhalten des durch Dialyse gewonnenen Meerschweinchenserum-Mittelstücks, das nach den Untersuchungen von Brand[1]) bereits bei 55° vollkommen thermolabil ist. Die Differenz dürfte aber nicht von wesentlicher Bedeutung sein, da ja zahlreiche Erfahrungen zu der Annahme berechtigen, daß die Thermolabilität durch das umgebende Milieu nicht unwesentlich beeinflußt werden kann. Außerdem ist zu berücksichtigen, daß sich die Angaben Brands auf das Mittelstück des Meerschweinchenserums beziehen, während es sich bei dem vorliegenden Versuch um ein aus dem Hammelblut stammendes Mittelstück handelt.

Aus Reihe D der Tabelle VI ergibt sich gleichzeitig, daß das „Kochsalz-Rohrzuckerblut“ beim Auflösen Mittelstück nicht liefert, was mit der bereits oben erwähnten Tatsache durchaus übereinstimmt, daß das sensibilisierte „Kochsalz-Rohrzuckerblut“ dem Endstück gegenüber unempfindlich ist.

1) l. c.

Ein weiterer Unterschied in dem Verhalten der lackfarbenen Blutlösung zu demjenigen des Mittelstücks erwies sich darin, daß erstere nur dann sich als wirksam erwies, wenn die Blutkörperchen vorher sensibilisiert waren, während beim gleichzeitigen Mischen der lackfarbenen Lösungen mit Ambozeptor, Blut und Endstück jegliche Wirkung ausblieb.

Dies ersehen wir aus folgender Versuchsanordnung:

In Reihe A wurden je 1 ccm mit absteigenden Ambozeptormengen sensibilisierte Blutaufschwemmung mit je 0,04 ccm Endstück und 0,1 ccm lackfarbene Blutlösung (die aus direktem Rohrzuckerblut hergestellt war und 10 Proz. Blut enthielt) digeriert.

In Reihe B wurde je 1 ccm einer Blutaufschwemmung mit absteigenden Ambozeptormengen und den entsprechenden Dosen Endstück und lackfarbenem Blut digeriert.

Das Ergebnis zeigt Tabelle VII.

Tabelle VII.

Mengen des Ambozeptors ccm	Hämolyse von 1 ccm Blutaufschwemmung durch 0,1 ccm lackfarbenes Blut aus direktem Rohrzuckerblut unter Zusatz von 0,04 ccm Endstück bei mit absteigenden Ambozeptormengen	
	A sensibilisiertem Blut	B gleichzeitig digeriertem Blut
0,025	komplett	0
0,015	„	0
0,01	„	0
0,005	„	0
0,0025	fast komplett	0
0,0015	stark	0
0,001	„	0
0,0005	mäßig	0
0,00025	wenig	0
0	0	0

Offenbar ist aber diese Differenz nur eine scheinbare, denn man muß bedenken, daß die lackfarbene Blutlösung außer dem in ihr enthaltenen Mittelstück auch die Stromata enthält, welche durch ihren Rezeptorenapparat die Ambozeptoren und damit wenigstens einen Teil des Mittelstücks von den unversehrten Blutkörperchen ablenken müssen.

Wir sind also nach diesen Erfahrungen zu der Schlußfolgerung berechtigt, daß in dem „direkten“ Rohrzuckerblut Mittelstück oder ein dessen Wirkung funktionell entsprechender Stoff vorhanden ist.

V. Ueber die in den Rohrzuckerblutaufschwemmungen enthaltene wirksame Substanz.

Nachdem in den Rohrzuckerblutaufschwemmungen eine Komponente festgestellt war, die sich in ihrer Funktion wie das Mittelstück verhielt, war die weitere Frage zu entscheiden, ob dieser Stoff in den roten Blutkörperchen enthalten ist oder denselben als eine aus dem Serum stammende Komponente nur adhäriert. Zwar konnte das bisher beschriebene Verhalten durch die Annahme eines „endocellulär" vorhandenen Mittelstücks eine Erklärung finden, andererseits mußte man aber auch damit rechnen, daß durch das Verdünnen des serumhaltigen Bluts mit salzfreier Rohrzuckerlösung die Möglichkeit einer Globulinfällung gegeben ist, und es war daher durchaus denkbar, daß das in den Rohrzuckerblutaufschwemmungen enthaltene Mittelstück aus dem Blutserum herrührt. Die weitere Erforschung mußte sich daher auf folgende Fragen erstrecken:

a) Enthält das Hammelserum überhaupt wirksames Mittelstück?
b) Gelingt es, Kochsalzblutaufschwemmungen durch Zusatz von Hammelserum und Waschen mit Rohrzuckerlösung derart zu verändern, daß sie sich wie „direkte" Rohrzuckerblutaufschwemmungen verhalten?

ad a).

Zunächst mußte naturgemäß die Frage entschieden werden, ob das Hammelserum überhaupt Mittelstück enthält. Daß es als Komplement für das von uns verwendete System unwirksam ist, dürfte bekannt sein, und auch ich habe eine komplementäre Wirkung des Hammelserums nicht konstatieren können. Was den etwaigen Gehalt an Mittelstück anlangt, so ist inzwischen aus den Untersuchungen von Liefmann und Cohn[1]) bekannt geworden, daß man den Albuminanteil des Meerschweinchenserums durch heterologe Globuline zu einer Komplementwirkung restituieren kann.

1) cf. Liefmann und Cohn, Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Bd. 6, Heft 1, p. 88, sowie 4. Tagung der freien Vereinigung für Mikrobiologie. (Mündliche Mitteilung von Herrn Prof. Sachs.)

Für das Hammelserum haben meine Untersuchungen diese Angaben bestätigt. Da das Hammelserum überhaupt einer komplementären Wirkung entbehrt, erübrigte es sich, die Dialyse vorzunehmen, und ich konnte mich damit begnügen, das Hammelserum als solches auf Mittelstückwirkung zu prüfen; es zeigte sich dabei eine Wirkung von ungeahnter Kraft, wofür die Tatsache als Beleg angeführt sei, daß gelegentlich noch 0,00015 ccm Hammelserum im Verein mit Meerschweinchenserum-Endstück komplette Hämolyse ambozeptorbeladener Blutkörperchen bewirkten. Um gleichzeitig das Verhalten dieser im Hammelserum vorhandenen Substanz gegenüber thermischen Einflüssen zu ergründen, verfuhr ich folgendermaßen:

Je 1 ccm sensibilisierter Blutaufschwemmung wurde mit 0,04 ccm Meerschweinchenserum-Endstück und absteigenden Mengen Hammelserums digeriert.

Das Hammelserum wurde benutzt in

Reihe B in nativem Zustand,

Reihe C $^1/_2$ Stunde auf 55° erhitzt,

Reihe D $^1/_2$ Stunde auf 60° erhitzt.

In Reihe A wurde Hammelserum ohne Endstückzusatz mit sensibilisiertem Blut digeriert.

Tabelle VIII.

Mengen des Hammelserums	Hämolyse von 1 ccm sensibilisierter (0,01 Ambozeptor) Blutaufschwemmung durch absteigende Mengen Hammelserum			
		bei Zusatz von 0,04 ccm Endstück		
ccm	A allein	B nativ	C $^1/_2$ Std. 55°	D $^1/_2$ Std. 60°
0,1	0	fast komplett	Spur	Spürchen
0,05	0	komplett	wenig	„
0,01	0	„	mäßig	„
0,005	0	„	wenig	„
0,001	0	„	Spur	„
0,0005	0	„	Spürchen	„
0,0001	0	stark	„	„
0,00005	0	mäßig	„	„
0,000025	0	„	„	„
0,000015	0	wenig	„	„
0,00001	0	Spur	„	„
0	0	Spürchen	„	„

Es ergibt sich also auch für die nach Art des Mittelstücks wirkende Substanz des Hammelserums eine etwas höhere

Thermostabilität als wir sie bei dem aus dem Meerschweinchenserum isolierten Mittelstück zu sehen gewohnt sind. Jedoch ist bei 55° bereits eine sehr erhebliche Reduktion der Wirkung eingetreten, die bei Erhitzen auf 60° vollständig aufgehoben ist. Es dürfte daher kein Grund zu der Annahme vorliegen, den hier nachgewiesen im Hammelserum vorhandenen Stoff mit dem Mittelstück nicht als wesensgleich zu erachten.

Daß große Mengen des Hammelserums eine Hemmung der Hämolyse bewirken, was bei dem auf 55° erhitzten Serum besonders markant in Erscheinung tritt, dürfte leicht verständlich sein, da ja größere Mittelstückmengen hemmend wirken und eine Ablenkung des Endstücks verursachen können. Es zeigte sich auch bei der Verwendung des Hammelserums die schon bei der Erörterung des Verhaltens der lackfarbenen Blutlösungen erwähnte Tatsache, daß beim Mischen von Hammelserum und Endstück mit Ambozeptor und Blut ohne vorheriges Sensibilisieren des letzteren die Hämolyse, wenn auch nicht ausbleibt, so doch nur in geringem Maße eintritt. Auch hier wird man nicht fehlgehen in der Annahme, daß eine Ablenkung des Mittelstücks durch das Zusammenwirken der im Hammelserum gelöst enthaltenen Antigene mit den entsprechenden Ambozeptoren stattfindet.

ad b).

Nachdem also festgestellt war, daß das Hammelserum in der Tat Mittelstück, und zwar in unvorhergesehenen Mengen enthält, war doch die oben diskutierte zweite Möglichkeit als wahrscheinlicher in Betracht zu ziehen. Wenn also wirklich der Gehalt des „direkten“ Rohrzuckerbluts an Mittelstück aus dem Serum stammte, so mußte es gelingen, die in der üblichen Weise hergestellte Kochsalzblutaufschwemmung durch Behandeln mit Rohrzuckerlösung, in der geeignete Mengen von Hammelserum gelöst waren, derart zu verändern, daß das so erhaltene Blut sich wie „direktes“ Rohrzuckerblut verhält. Der Nachweis, daß dem so ist, ist mir in der Tat gelungen.

Die Sedimente von je 20 ccm 8-proz. Kochsalzblutaufschwemmung wurden mit Rohrzuckerlösung gewaschen und

A mit 20 ccm 8-proz. Hammelserum in Rohrzuckerlösung,

B mit 20 ccm Rohrzuckerlösung

gemischt, sodann zentrifugiert, die Sedimente mit reichlichen Mengen Rohrzuckerlösung gewaschen und auf je 20 ccm in Rohrzuckerlösung aufgeschwemmt.

In zwei Parallelreihen wurden nun je 1 ccm der derart gewonnenen Blutaufschwemmungen mit absteigenden Mengen Ambozeptor in Rohrzuckerlösung sensibilisiert.

Die mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschenen Blutsedimente wurden endlich unter Zusatz von 0,025 ccm Endstück in Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

Das Ergebnis zeigt Tabelle IX.

Tabelle IX.

Menge des zur Sensibilisierung benutzten Ambozeptors ccm	Hämolyse von 1 ccm mit absteigenden Mengen Ambozeptor sensibilisierter Hammelblutaufschwemmung durch 0,025 ccm Endstück	
	A Blut mit Hammelserum digeriert	B Blut nativ
0,05	komplett	0
0,025	„	0
0,01	„	0
0,005	stark	0
0,0025	mäßig	0
0,0015	„	0
0,001	wenig	0
0	0	0

Wie die Tabelle zeigt, hat sich unsere Erwartung wirklich als richtig erwiesen. Es gelingt durch Digerieren des Kochsalzblutes mit Hammelserum in Rohrzuckerlösung das Blut derart zu verändern, daß es nunmehr ebenso wie das „direkte“ Rohrzuckerblut nach dem Sensibilisieren in Rohrzuckerlösung dem Endstück gegenüber empfindlich ist. Daß das einfache Waschen mit Rohrzuckerlösung ohne Zusatz von Hammelserum nicht zu dem gleichen Resultat führt, ergibt sich bereits aus früheren Versuchen, sowie auch aus der eigens angestellten Kontrolle B.

Die Uebereinstimmung mit dem Verhalten des „direkten“ Rohrzuckerbluts konnte auch dadurch erwiesen werden, daß aus dem mit Hammelserum in Rohrzuckerlösung vorbehandelten Kochsalzblut sich lackfarbene Blutlösungen gewinnen ließen, welche gleichfalls im Sinne des Mittelstücks wirkten, wie dies folgender Versuch zeigt.

Absteigende Mengen lackfarbener Blutlösung (enthaltend etwa 15 Proz. Blut) wurden mit je 1 ccm sensibilisierter (0,01 Ambozeptor) Blutaufschwemmung und 0,025 ccm Endstück digeriert.

Die lackfarbene Blutlösung war gewonnen in

Reihe A: aus Kochsalzblut nach Ueberführen in Rohrzuckerlösung unter Zusatz von Hammelserum.

Reihe B: aus Kochsalzblut nach Ueberführen in Rohrzuckerlösung (ohne Hammelserum), s. Tabelle X.

Tabelle X.

Mengen der lackfarbenen Blutlösung	Hämolyse von 1 ccm mit 0,01 Ambozeptor sensibilisierter Blutaufschwemmung durch 0,025 Endstück und absteigende Mengen lackfarbener Blutlösung	
ccm	A	B
1,0	komplett	0
0,5	stark	0
0,25	mäßig	0
0,15	wenig	0
0	0	0

Nach alledem müssen wir der Annahme zuneigen, daß das eigentümliche Verhalten des „direkten“ Rohrzuckerbluts wenigstens zu einem wesentlichen Teil davon herrührt, daß bei der Herstellung direkter Rohrzuckerblutaufschwemmungen Bestandteile des Serums den Blutkörperchen adhärieren.

Diese Tatsache konnte auch noch durch eine weitere Methode bestätigt werden, die sich zu den bisher beschriebenen Verfahren gewissermaßen wie das Negativ zum Positiv verhält. Wenn nämlich das in dem Rohrzuckerblut nachweisbare Mittelstück aus dem Serum stammt, so mußte der entsprechende Anteil des Mittelstücks aus dem durch Zentrifugieren einer Mischung von nativem Blut und Rohrzuckerlösung erhaltenen Abguß verschwunden sein. Ein vollständiger Mittelstückschwund war naturgemäß von vornherein nicht zu erwarten, und die Untersuchung mußte daher eine vergleichende sein, wobei der entsprechende Abguß einer Mischung von nativem Blut und Kochsalzlösung als Kontrolle diente. Es wurde demnach folgendermaßen verfahren:

Je 1 ccm natives Hammelblut wurde verdünnt mit
I. 9 ccm physiologischer Kochsalzlösung,
II. 9 ccm Rohrzuckerlösung.

Durch Zentrifugieren wurden die entsprechenden Serumverdünnungen I und II erhalten.

Dieselben wurden auf Mittelstückwirkung geprüft, indem absteigende Mengen mit je 1 ccm sensibilisierter (0,01 Ambozeptor) Kochsalzblutaufschwemmung und 0,05 ccm Endstück digeriert wurden.

Die durch Zentrifugieren erhaltenen Blutsedimente wurden (ohne weiteres Waschen) lackfarben gemacht und auf ein Volumen von je 10 ccm gebracht. Auch diese lackfarbenen Blutlösungen wurden auf Mittelstückwirkung geprüft [1]).

Tabelle XI.

Menge der Abgüsse resp. lackfarbenen Blutlösungen	Hämolyse von 1 ccm sensibilisierter (0,01 Ambozeptor) Blutaufschwemmung durch 0,05 ccm Endstück und absteigende Mengen			
	A Abgüsse		B lackfarbene Blutlösungen	
ccm	I	II	I	II
1,0	stark	fast komplett	komplett	komplett
0,5	komplett	komplett	„	„
0,25	„	„	„	„
0,15	„	„	fast komplett	„
0,1	„	„	stark	„
0,05	„	„	mäßig	„
0,025	„	fast komplett	wenig	fast komplett
0,015	„	stark	Spur	stark
0,01	fast komplett	„	„	mäßig
0,005	stark	mäßig	„	wenig
0,0025	mäßig	wenig	„	„
0	Spur	Spur	„	Spur

Wie die Tabelle XI zeigt, enthält in der Tat die durch Verdünnen des Blutes mit Kochsalzlösung erhaltene Zwischenflüssigkeit eine größere Menge von Mittelstück als die nach dem Verdünnen mit Rohrzuckerlösung gewonnene. Es ist also wirklich in dem mit Rohrzuckerlösung verdünnten Blute Mittelstück in das Sediment mitgerissen worden. Dem entsprechend

1) Es sei übrigens erwähnt, daß der mit Rohrzuckerlösung gewonnene Abguß vor dem Gebrauch mit 10-proz. Kochsalzlösung besalzen wurde. Daß aber nicht etwa durch einen gleichzeitigen Gehalt an Rohrzucker in Kochsalzlösung die verminderte Hämolyse bedingt war, zeigte sich dadurch, daß der mit Kochsalzlösung gewonnene Abguß auch nach Aufnahme der entsprechenden Rohrzuckermenge unverändert wirksam war.

finden wir die aus diesem Blutsediment hergestellte lackfarbene Lösung von einer erheblichen Wirkung, die etwa mit derjenigen der Zwischenflüssigkeit übereinstimmt. Man kann daher annehmen, daß in diesem Falle etwa die Hälfte des Mittelstücks aus dem Hammelserum von den roten Blutkörperchen mitgerissen wurde, ohne selbstverständlich die quantitative Seite dieser Schlußfolgerung verallgemeinern zu können[1]). Auch dieser Versuch spricht also im Sinne der Herkunft des in der Rohrzuckerblutaufschwemmung vorhandenen Mittelstücks aus dem Hammelserum.

In welcher Weise das Mittelstück bei der Herstellung des „direkten" Rohrzuckerblutes niedergerissen wird, soll dahingestellt bleiben. Es kommen ja verschiedene Möglichkeiten in Betracht. Einmal könnte es sich einfach um einen Globulinniederschlag handeln, zu dessen Bildung ja die Bedingungen vorhanden sind. Allerdings konnte von Hammelserum, das in entsprechenden Verhältnissen mit Rohrzuckerlösung verdünnt wurde, erst nach längerem Stehen durch Zentrifugieren ein Niederschlag erhalten werden, während nach sofortigem Zentrifugieren, wie es bei der Herstellung der Rohrzuckerblutaufschwemmung erfolgte, eine sichtbare Präzipitation kaum wahrnehmbar war. Immerhin könnte ja durch die Blutkörperchen ein Mitreißen eines sich bildenden, aber an und für sich noch nicht zentrifugablen Präzipitats stattfinden.

Andererseits wird man an die Möglichkeit denken müssen, daß das Mittelstück seitens der roten Blutkörperchen im salzfreien Medium eine Adsorption erfährt und auf diese Weise in die Aufschwemmung gelangt. Freilich müßte man dann annehmen, daß durch physiologische Kochsalzlösung das adsorbierte Mittelstück den Blutkörperchen wieder entrissen wird.

Wie dem aber auch sei, jedenfalls ergibt sich, daß direkt in Rohrzuckerlösung hergestellte Hammelblutaufschwemmungen Mittelstück enthalten, das zu einem wesentlichen Teil aus dem

1) Die aus dem mit Kochsalzlösung behandelten Blutsediment hergestellte lackfarbene Lösung enthält noch etwas Mittelstück, was aber darauf zu beziehen ist, daß in diesem Fall ein Auswaschen des Sediments unterlassen wurde. Trotzdem aber tritt der Unterschied im Vergleich zu der Wirkung des aus der Rohrzuckerverdünnung erhaltenen Blutsediments deutlich hervor.

Serum stammt. Für die Frage, ob außerdem die roten Blutkörperchen „endocellulär“ gelegenes Mittelstück enthalten, konnten bestimmte Anhaltspunkte nicht gewonnen werden, wenn auch nichts gegen diese Möglichkeit spricht.

Von dem gewonnenen Standpunkte aus dürfte auch die durch Tabelle III und IV illustrierte Hemmung der Wirkung des Endstückes auf in Kochsalzlösung sensibilisiertes direktes Rohrzuckerblut durch einen Ambozeptorüberschuß erklärlich erscheinen. Denn wenn in Rohrzuckerlösung Blutserumbestandteile überhaupt sedimentieren, so dürfte ja der Annahme nichts im Wege stehen, daß in den derart hergestellten Rohrzuckerblutaufschwemmungen auch Serumstoffe von antigenartiger Wirkung vorhanden sind. Die Hemmung bei einem Ambozeptorüberschuß erscheint dann wiederum in Sinne einer Bindungserscheinung, die aus dem Zusammenwirken von Antigen und Ambozeptor resultiert, verständlich.

Das erörterte Verhalten der in Rohrzuckerlösung hergestellten Hammelblutaufschwemmungen dürfte auch methodisch von größter Wichtigkeit sein und wird bei künftigen Untersuchungen über die Wirkung der Hämolysine im salzfreien Medium nicht außer acht gelassen werden können.

VI. Zur Frage der Beziehungen des Mittelstücks zu den ambozeptorbeladenen Blutzellen im salzfreien Medium.

Die große Bedeutung der beschriebenen Erscheinungen zeigte sich bereits bei der Analyse der Frage über das Verhalten des Komplements zu den ambozeptorbeladenen Blutzellen in Rohrzuckerlösung, und erst bei der Untersuchung dieses Problems, das den Ausgangspunkt der vorliegenden Untersuchungen bildete, ergaben sich die Direktiven für die Beantwortung der bisher erörterten Fragen.

Um zu erforschen, ob beim Digerieren von ambozeptorbeladenen Blutzellen mit Meerschweinchenserum im salzfreien Medium eine Bindung des Mittelstücks erfolgt, bin ich naturgemäß ursprünglich von „direktem“ Rohrzuckerblut ausgegangen und suchte festzustellen, ob das mit Meerschweinchenserum sensibilisierte Blut sich als persensibilisiert erweist, also auf alleinigen Zusatz von Endstück sich löst.

Es wurde folgendermaßen verfahren:

Als Ausgangsmaterial diente „direkte“ Rohrzuckerblutaufschwemmung, welche in Rohrzuckerlösung mit 50 Ambozeptoreinheiten (0,025 ccm) pro Kubikzentimeter Blutaufschwemmung sensibilisiert war.

Das sensibilisierte Blut wurde in 3 Teile geteilt.

A: wurde nach dem Sensibilisieren in physiologische Kochsalzlösung übergeführt.

B: 20 ccm desselben sensibilisierten Blutes wurden mit 1 ccm aktivem Meerschweinchenserum und 19 ccm Rohrzuckerlösung 1 Stunde bei 37° digeriert, sodann wurde zentrifugiert, das Sediment in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und wieder in Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

C: 20 ccm sensibilisierten Blutes wurden wie bei B behandelt, nur mit dem Unterschiede, daß das Meerschweinchenserum inaktiviert war.

Je 1 ccm der derart vorbehandelten Blutaufschwemmungen wurde mit absteigenden Mengen Endstück digeriert.

Das Ergebnis zeigt Tabelle XII.

Tabelle XII.

Menge des Endstücks	Hämolyse von 1 ccm vorbehandelter Blutaufschwemmungen durch absteigende Mengen Endstücks		
ccm	Blut A	Blut B	Blut C
0,1	fast komplett	komplett	komplett
0,05	stark	„	fast komplett
0,025	mäßig	„	stark
0,015	wenig	„	mäßig
0,01	Spur	fast komplett	wenig
0,005	0	mäßig	Spürchen
0,0025	0	wenig	0
0	0	Spürchen	0

Aus der Tabelle XII ergibt sich, daß das mit aktivem Meerschweinchenserum im salzfreien Medium behandelte sensibilisierte Blut B sich in der Tat als persensibilisiert erweist, also Mittelstück gebunden hat. Zugleich zeigte sich aber, daß auch in der Reihe A, in der nur das in Rohrzuckerlösung sensibilisierte Hammelblut zur Verwendung kam, eine ziemlich starke hämolytische Wirkung des Endstücks zu konstatieren ist, während, wie besondere Kontrollversuche ergaben, bei Verwendung von sensibilisiertem Kochsalzblut die Hämolyse ausblieb.

Die weitere Erforschung dieser Erscheinung führte zu der Erkenntnis des in den vorigen Abschnitten der Arbeit analysierten Prinzips.

Der Unterschied zu dem Verhalten des auch mit Meerschweinchenserum digerierten sensibilisierten Rohrzuckerbluts (Reihe B) ist immerhin recht eklatant und, wie der Vergleich in der Kontrollreihe C zeigt, ist das im Meerschweinchenserum wirkende Prinzip thermolabil.

Wir sind also zu dem Schlusse berechtigt, daß es in der Tat gelingt, durch Digerieren sensibilisierten Rohrzuckerbluts mit Meerschweinchenserum das Blutsediment mit Mittelstück derart zu beladen, daß das nunmehr in physiologische Kochsalzlösung übergeführte Blut sich als persensibilisiert erweist[1]).

Der hier beschriebene Vorgang bildet zugleich eine sehr einfache Methode zur Gewinnung persensibilisierten Blutes, nur ist es, wie meine Erfahrungen gezeigt haben, erforderlich, das Blut vor dem Digerieren mit Meerschweinchenserum zu sensibilisieren. Wird nämlich Ambozeptor und Meerschweinchenserum gleichzeitig mit dem Blut digeriert, so tritt sehr oft bereits partielle Hämolyse ein, die wohl auf die im salzfreien Medium stärker wirkenden normalen Hämolysine des Meerschweinchenserums zu beziehen ist. Möglicherweise ist die Ursache des Ausbleibens der Hämolyse im ersteren Falle darin gelegen, daß die Bindung des Immunambozeptors dem normalen Ambozeptor den Zugang zu den Blutkörperchenrezeptoren sperrt[2]).

Für die hier interessierende Frage, ob beim Digerieren von Komplement mit ambozeptorbeladenen Blutzellen im salzfreien Medium eine isolierte Bindung des Mittelstücks statt-

1) Daß dabei nicht etwa das Gesamtkomplement gebunden wird und die Blutkörperchen sich bereits beim Ueberführen in physiologische Kochsalzlösung an und für sich lösen, ist bereits in einem früheren Abschnitt (III) erwiesen worden.

2) Außer diesem Verfahren kann natürlich bereits die Sensibilisierung des „direkten" Rohrzuckerbluts in Rohrzuckerlösung als Methode zur Gewinnung persensibilisierten Blutes dienen, wenn auch bemerkt werden muß, daß die Empfindlichkeit des „direkten" sensibilisierten Rohrzuckerblutes gegenüber dem Endstück in ziemlichen weiten Grenzen variiert.

findet, mußte es natürlich wünschenswert erscheinen, die Blutaufschwemmung so zu gestalten, daß sie durch den Ambozeptor allein nicht „persensibilisiert“ erscheint. In den vorigen Abschnitten hat sich ergeben, daß dies in leichter Weise dadurch erreicht werden kann, daß das Blut mit physiologischer Kochsalzlösung gründlich gewaschen und erst dann in Rohrzuckerlösung übergeführt wird („Kochsalz-Rohrzuckerblut“). Wenn aber auch durch die Verwendung des „Kochsalz-Rohrzuckerbluts“ die Interferenz des aus dem Hammelserum stammenden Mittelstücks ausgeschaltet ist, so war andererseits die Möglichkeit gegeben, daß beim Digerieren des komplettierenden Meerschweinchenserums in Rohrzuckerlösung mit den Blutkörperchen wiederum Mittelstück des Meerschweinchenserums sedimentiert, so daß sich für die Beurteilung der Bindung des Mittelstücks an die ambozeptorbeladenen Blutzellen auch bei dieser Anordnung von vornherein Schwierigkeiten ergaben.

Wie berechtigt diese Vermutung war, zeigt das folgende Versuchsbeispiel. In demselben wurde insofern etwas abweichend von dem in Tabelle XII wiedergegebenen Versuch verfahren, als eine gleichbleibende Meerschweinchenserummenge — um die Wirkung der Normalhämolysine zu vermeiden — in geringer Dosis gewählt wurde und die Blutkörperchen eine verschiedengradige Sensibilisierung erfuhren.

Je 1 ccm „Kochsalzrohrzuckerblut“ wurde digeriert in

Reihe A: mit absteigenden Mengen des Ambozeptors und je 0,025 ccm Meerschweinchenserum in Rohrzuckerlösung.

Reihe B: mit absteigenden Mengen des Ambozeptors.

Reihe C: mit je 0,025 ccm Meerschweinchenserum in Rohrzuckerlösung.

Nach 1-stündigem Aufenthalt bei 37° wurden sämtliche Röhrchen zentrifugiert.

Die Sedimente der Reihen A und B wurden nunmehr mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und in Kochsalzlösung unter Zusatz von 0,04 ccm Meerschweinchenserum-Endstück aufgeschwemmt.

Die Sedimente der Reihe C wurden mit Rohrzuckerlösung gewaschen und mit absteigenden Ambozeptormengen in Rohrzuckerlösung noch einmal 1 Stunde bei 37° digeriert. Sodann erfolgte wiederum Zentrifugieren, Waschen mit Kochsalzlösung und Aufschwemmung der Sedimente in Rohrzuckerlösung unter Zusatz von 0,04 ccm Endstück.

Das Ergebnis ist in Tabelle XIII notiert.

Tabelle XIII.

Mengen des Ambozeptors	Hämolyse von 1 ccm mit absteigenden Ambozeptormengen sensibilisierten „Kochsalzrohrzuckerblutes“		
ccm	A	B	C
0,05	komplett	mäßig	komplett
0,025	„	wenig	„
0,015	„	0	fast komplett
0,01	stark	0	mäßig
0,005	mäßig	0	wenig
0,0025	wenig	0	Spur
0,0015	Spürchen	0	Spürchen
0	0	0	0

Wie die Tabelle XIII zeigt, ist durch Einwirken von Ambozeptor und Komplement in Rohrzuckerlösung (Reihe A und C) das Blut persensibilisiert worden, während sich aus Reihe B ergibt, daß das Endstück nur bei größten Ambozeptordosen eine partielle Hämolyse bewirkt, wenn das Meerschweinchenserum bei der Vorbehandlung gefehlt hat. Andererseits ergibt sich aber aus dem Vergleich der Reihen A und C, daß es nur von sehr geringer Bedeutung ist, ob man das Meerschweinchenserum gleichzeitig mit dem Ambozeptor einwirken läßt oder es vor dem Sensibilisieren mit den Blutkörperchen im salzfreien Medium digeriert und den gelöst gebliebenen Anteil durch Zentrifugieren und Waschen entfernt. Offenbar handelt es sich hier um ganz analoge Verhältnisse wie bei der Gewinnung des „direkten“ Rohrzuckerbluts. Das Meerschweinchenserum gibt augenscheinlich ebenso wie das Hammelserum im salzfreien Medium bereits an und für sich Mittelstück an die Blutkörperchensedimente ab. Besteht also kein Zweifel darüber, daß es gelingt, durch Digerieren von sensibilisiertem Blut und Meerschweinchenserum im salzfreien Medium die Blutkörperchen derart zu präparieren, daß sie sich nach Ueberführen in physiologische Kochsalzlösung als persensibilisiert erweisen, so muß es eine offene Frage bleiben, ob in der Tat die Bindung des Mittelstücks bereits im salzfreien Medium erfolgt oder ob das Mittelstück nicht den ambozeptorbeladenen Blutzellen ebenso wie den nativen Erythrocyten adhäriert und erst nach dem Ueberführen in physiologische Kochsalzlösung eigentlich gebunden wird.

Daß jedenfalls eine wirkliche Bindung des Mittelstücks stattfindet, die aber immerhin erst im salzhaltigen Milieu rasch zu erfolgen braucht, ergibt sich daraus, daß die erst sensibilisierten und dann mit Meerschweinchenserum in Rohrzuckerlösung digerierten Blutkörperchen auch trotz wiederholten Waschens mit physiologischer Kochsalzlösung persensibilisiert bleiben, während beim Digerieren des Meerschweinchenserums mit den intakten Blutkörperchen vor dem Ambozeptorzusatz das Einschalten eines Auswaschens mit physiologischer Kochsalzlösung genügt, um die Empfindlichkeit der dann sensibilisierten Blutkörperchen gegenüber dem Endstück aufzuheben, also offenbar ausreicht, um das nur in lockerer Beziehung adhärierende Mittelstück wieder auszuschwemmen.

Ferner ließen es vergleichende Untersuchungen zweifelhaft erscheinen, ob überhaupt eine wirkliche Bindung von Mittelstück durch ambozeptorbeladene Blutzellen im salzfreien Medium vorliegt. Es wurden nämlich die Verluste von wirksamer Substanz, welche das Meerschweinchenserum beim Digerieren in Rohrzuckerlösung einerseits mit nativen Blutkörperchen, andererseits mit sensibilisierten Blutkörperchen erfährt, miteinander verglichen. Es entspricht dieser Vorgang dem als zweite Methode im Abschnitt III beschriebenen Verfahren. Um den Verlust an Mittelstück zu ermitteln, mußte das digerierte Meerschweinchenserum einerseits auf sensibilisierte, andererseits auf persensibilisierte Blutkörperchen geprüft wurden.

Zu diesen Versuchen wurde zum Persensibilisieren des Blutes derart verfahren, daß das sensibilisierte Blut mit Meerschweinchenserum-Mittelstück, das durch Dialyse gewonnen und 24 Stunden in physiologischer Kochsalzlösung gelagert hatte, digeriert wurde. Bereits durch Brand ist ja bekannt, daß das Mittelstück in Salzlösung sehr rasch seine Funktion verliert, beim Mischen mit Endstück als Komplement zu wirken. Da diese Modifikation darauf beruht, daß sich das Kochsalzmittelstück mit dem Endstück zu einem unwirksamen Komplex vereinigt, aber an und für sich mit der ambozeptorbeladenen Blutzelle noch reagiert, so stellt das 24-stündige Lagern in Kochsalzlösung ein sehr einfaches Mittel dar, um die in der Regel in der Mittelstückkomponente vorhandenen

Endstückanteile außer Funktion zu setzen. Man gelangt so — wenigstens bei großen Ambozeptordosen — zu einem sehr einfachen Verfahren, eine sichere und hochgradige Persensibilisierung zu erreichen, was auch für fernere Untersuchungen empfohlen werden kann.

Zur Analyse der erörterten Frage wurde folgendermaßen verfahren:

Absteigende Mengen Meerschweinchenserums wurden in zwei Parallelreihen:

einerseits mit je 1 ccm Kochsalzrohrzuckerblutaufschwemmung, Reihen b,

andererseits mit je 1 ccm sensibilisiertem Kochsalzrohrzuckerblut (0,01 ccm Ambozeptor), Reihen c,

in Rohrzuckerlösung $1^1/_4$ Stunde bei 37° digeriert (Gesamtvolumen 2 ccm)[1].

Sodann wurde zentrifugiert, die Abgüsse mit je 0,1 ccm 10-proz. Kochsalzlösung besalzen und digeriert:

Ib und Ic mit je 0,25 ccm 4-fach konzentrierter sensibilisierter (0,01 ccm Ambozeptor),

IIb und IIc mit je 0,25 ccm 4-fach konzentrierter persensibilisierter (0,01 Ambozeptor + 0,075 ccm Kochsalzmittelstück) Kochsalzblutaufschwemmung.

Als Kontrollen dienten die Reihen Ia und IIa, welche die Wirkung des nativen Meerschweinchenserums auf sensibilisiertes und persensibilisiertes Blut illustrieren.

Das Ergebnis zeigt Tabelle XIV.

Tabelle XIV.

Mengen des Meerschw.-Serums	Hämolyse von Hammelblut					
	I. Sensibilisiert			II. Persensibilisiert		
ccm	a	b	c	a	b	c
0,1	komplett	komplett	f. kompl.	komplett	komplett	komplett
0,05	„	f. kompl.	„	„	„	„
0,025	„	stark	stark	„	„	„
0,015	f. kompl.	mäßig	mäßig	„	„	„
0,01	stark	wenig	wenig	„	„	„
0,005	mäßig	„	„	f. kompl.	mäßig	stark
0,0025	wenig	0	0	mäßig	Spur	wenig
0	0	0	0	0	0	0

Aus der Tabelle ergibt sich, insbesondere aus dem Verhalten der Reihen I (a, b, c), daß die Abnahme der Komplementwirkung, welche das Meerschweinchenserum beim Digerieren mit sensibilisiertem

1) Um die Zerstörung des Meerschweinchenserums bei Aufenthalt im salzfreien Medium nach Möglichkeit zu vermeiden, wurde 24 Stunden altes Serum in diesem und im nächsten Versuch benutzt.

Blut in Rohrzuckerlösung erfahren hat (Ic), keinesfalls größer war, als die beim Digerieren mit nativem Blut (Reihe Ib) zu beobachtende. Da die Abnahme überhaupt keine sehr erhebliche war, so ist dieser Versuch nicht dazu geeignet, für das Obwalten einer besonderen Affinität der ambozeptorbeladenen Blutzelle zu dem Mittelstück im salzfreien Medium zu sprechen. Andererseits zeigen die Reihen II, daß die Abnahme der Komplementwirkung, welche überhaupt zu verzeichnen war, sich nur auf das Mittelstück bezieht. Denn die auf persensibilisiertes Blut geprüfte Endstückwirkung zeigte nur eine äußerst geringe Abnahme, die bereits bei Berücksichtigung der beim Abgießen entstandenen Verluste eine hinreichende Erklärung finden dürfte.

Wenn auch die bisherigen Versuche einen Anhaltspunkt nicht dafür gewinnen ließen, daß eine Bindung des Mittelstücks an ambozeptorbeladene Blutkörperchen in Rohrzuckerlösung erfolgt, so möchten wir eine solche doch keineswegs ausschließen. Einige Erfahrungen, die wir bei Anwendung des im Abschnitt III als erste Methode des Nachweises beschriebenen Verfahrens machen konnten, wiesen darauf hin, daß unter Umständen doch analoge Verhältnisse demonstrabel sein könnten, wie sie sich bei der Analyse der Beziehungen zwischen Komplement und ambozeptorbeladenen Blutzellen bei tiefen Temperaturen ergeben haben.

Das Verfahren, um das es sich hier handelt, besteht darin, daß die Abgüsse von Meerschweinchenserum, das mit ambozeptorbeladenen Blutkörperchen digeriert war, einerseits auf entsprechend sensibilisierte Blutkörperchen, andererseits auf die Sedimente des Blutes, auf das das Meerschweinchenserum eingewirkt hatte, zur Einwirkung gelangten. Wenn wir in dieser Weise verfuhren, zeigte es sich in der Regel, daß die Abgüsse auf sensibilisiertes Blut und auf das Blut, von dem sie stammten, zwar verschieden einwirkten, aber stets in gleichem Sinne, gleichgültig welche Ambozeptordosis zum Sensibilisieren gedient hatte. Das stimmt mit der beschriebenen Erfahrung überein, nach der bereits die nicht sensibilisierten Blutkörperchen im salzfreien Medium eine Abtrennung des Mittelstücks in gleicher Weise bewirken, wie die sensibilisierten.

Gelegentlich wurde aber doch ein abweichendes Verhalten insofern beobachtet, als bei schwachem Sensibilisierungsgrade das Komplement nicht wesentlich verändert wurde, während bei starker Sensibilisierung ein isolierter Schwund der Mittelstückkomponente zu verzeichnen war.

Derartige Ergebnisse wurden einige Male gerade während der ersten Zeit der Untersuchungen erhalten, und daraus erklärt es sich, daß in dem folgenden Beispiel noch „direktes" Rohrzuckerblut zur Anwendung kam.

Absteigende Mengen 1 Tag alten Meerschweinchenserums wurden in zwei Parallelreihen α und β mit sensibilisiertem Rohrzuckerblut in Rohrzuckerlösung 1 Stunde bei 37° digeriert (Gesamtvolumen 2 ccm).

Die Sensibilisierung des Rohrzuckerblutes war erfolgt im
Versuchsteil I mit 0,02 ccm Ambozeptor (40 AE.).
Versuchsteil II mit 0,002 ccm Ambozeptor (4 AE.).

Nach dem Zentrifugieren der Röhrchen wurde folgendermaßen verfahren:

A: Die Abgüsse der Reihen α wurden auf je 0,25 ccm 4-fach konzentriertes entsprechend sensibilisiertes Rohrzuckerblut gegossen und mit je 0,1 ccm 10-proz. Kochsalzlösung besalzen.

B: Die Abgüsse der Reihen β wurden mit den Sedimenten der Reihen α unter Zusatz von je 0,1 ccm 10-proz. Kochsalzlösung digeriert.

C: Die Sedimente der Reihen β wurden mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und in Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

D: In Reihe D ist zur Kontrolle die Wirkung absteigender Mengen Meerschweinchenserums auf entsprechend sensibilisiertes Blut angegeben. Die Gemische blieben auch hier in Rohrzuckerlösung 1 Stunde bei 37° und wurden erst dann durch Zusatz von 0,1 ccm 10-proz. Kochsalzlösung der hämolytischen Wirkung zugänglich gemacht.

Das Ergebnis zeigt Tabelle XV.

Tabelle XV.

Menge des Meerschweinchenserums ccm	I. Hämolyse von 1 ccm Hammelblut, sensibilisiert mit 0,02 Ambozeptor			
	A	B	C	D
0,1	fast komplett	komplett	Spur	komplett
0,05	mäßig	„	„	„
0,025	wenig	„	„	„
0,015	Spur	„	0	„
0,01	0	stark	0	fast komplett
0,005	0	wenig	0	mäßig
0,0025	0	Spur	0	wenig
0	0	0	0	0

Menge des Meerschweinchen-serums ccm	II. Hämolyse von 1 ccm Hammelblut, sensibilisiert mit 0,002 Ambozeptor			
	A	B	C	D
0,1	komplett	komplett	Spur	komplett
0,05	„	fast komplett	Spürchen	„
0,025	mäßig	„	0	fast komplett
0,015	Spur	mäßig	0	stark
0,01	„	wenig	0	mäßig
0,005	0	„	0	wenig
0,0025	0	Spur	0	Spur
0	0	0	0	0

Aus Tabelle XV ergibt sich ein abweichendes Verhalten des schwächer und stärker sensibilisierten Blutes gegenüber dem Komplement in salzfreiem Medium. Während das schwächer sensibilisierte Blut das Komplement nur relativ wenig abgeschwächt hat, finden wir bei dem stark sensibilisierten Blut eine nicht unerhebliche Abnahme der Komplementwirkung, die aber durch den an das Sediment gebundenen Anteil wieder vollkommen restituiert werden kann. In diesem Versuch hat es also den Anschein, als ob der Sensibilisierungsgrad von Bedeutung für die Bindung des Mittelstücks im salzfreien Medium wäre. Da aber das schwach sensibilisierte Blut Unterschiede aufweist gegenüber dem Verhalten, wie es sich nach den geschilderten Erfahrungen als Regel ergeben hat und es auch nur gelegentlich gelang, den hier geschilderten Ausfall des Versuches zu erzielen, so möchte ich vorläufig auf diesen Befund keinen besonderen Wert legen. Weitere Untersuchungen werden entscheiden müssen, ob hier zufällige Momente interferieren, oder ob sich die Methode derart gesetzmäßig gestalten läßt, daß eine wirkliche Bindung des Mittelstücks an die ambozeptorbeladenen Blutzellen im salzfreien Medium angenommen werden kann.

Zusammenfassung.

1) Um die Agglutination des Hammelblutes in Rohrzuckerlösung zu vermeiden, empfiehlt es sich, das Blut unter reichlichem Luftzutritt zu defibrinieren resp. zu schütteln, das

serumhaltige Blut direkt mit Rohrzuckerlösung zu verdünnen und dann zu waschen. Auch für die Darstellung von Hammelblutaufschwemmungen in Rohrzuckerlösung nach Ueberführen aus Kochsalzlösung erweist sich der beschriebene Vorgang als geeignet.

2) Aufschwemmungen von Hammelblut, welche direkt in Rohrzuckerlösung hergestellt sind, werden nach der Sensibilisierung durch die Endstückkomponente des Komplements gelöst, im Gegensatz zu dem Verhalten von Kochsalzblutaufschwemmungen oder Rohrzuckerblutaufschwemmungen, welche durch Ueberführung aus Kochsalzlösung erhalten wurden.

3) Die Ursache hierfür ist darin zu erblicken, daß die „direkten" Rohrzuckerblutaufschwemmungen Stoffe enthalten, welche in ihrer Funktion der Mittelstückkomponente des Komplements entsprechen. Lackfarbene Lösungen aus dem „direkten" Rohrzuckerblut wirken nämlich wie das Mittelstück.

4) Das in den Rohrzuckerblutaufschwemmungen enthaltene Mittelstück stammt wenigstens zu einem wesentlichen Teil aus dem Hammelserum, denn

a) das Hammelserum enthält nach Art des Mittelstücks wirkende Stoffe in sehr beträchtlicher Menge, während wirksames Komplement für das benutzte hämolytische System in üblicher Weise nicht nachweisbar ist;

b) durch Digerieren von gewöhnlichem Kochsalzblutsediment mit Hammelserum, das in Rohrzuckerlösung verdünnt ist, und nachheriges Waschen des Blutes mit Rohrzuckerlösung gelingt es, das Kochsalzblut derart zu verändern, daß es sich wie „direktes" Rohrzuckerblut verhält.

5) Bei dem Waschen von nativem Hammelblut mit Rohrzuckerlösung adhäriert also offenbar ein gewisser Teil des im Serum vorhandenen Mittelstücks an den Blutkörperchen. Dieses adhärierende Mittelstück wird durch Waschen mit Rohrzuckerlösung nicht entfernt, dagegen gelingt es, dasselbe durch physiologische Kochsalzlösung wieder zu extrahieren.

6) Ob der Uebergang des Mittelstücks aus dem Serum in das Blutkörperchensediment vermittels Rohrzuckerlösung

im Sinne einer Globulinfällung oder im Sinne einer Adsorption aufzufassen ist, muß dahingestellt bleiben. Im letzteren Falle müßte man annehmen, daß die Adsorption nur im salzfreien Medium erfolgt und in Kochsalzlösung wieder reversibel ist.

7) Daß außerdem auch in den roten Blutkörperchen endocellulär gelegenes Mittelstück vorhanden ist, ist möglich, konnte aber nicht erwiesen werden.

8) Durch das geschilderte Verhalten des Blutes im salzfreien Milieu kann eine Entscheidung der Frage, ob beim Digerieren ambozeptorbeladener Blutkörperchen mit Komplement im salzfreien Medium das Mittelstück mit ersteren reagiert, vorläufig nicht getroffen werden. Denn es zeigte sich, daß auch die nativen Erythrocyten aus dem komplementhaltigen Meerschweinchenserum im salzfreien Medium sich mit Mittelstück „beladen". Ein Unterschied gegenüber ambozeptorbeladenen Blutkörperchen ist insofern zu konstatieren, als aus den letzteren das Mittelstück durch physiologische Kochsalzlösung nicht mehr auswaschbar ist. Es erscheint aber zweifelhaft, ob die feste Bindung des Mittelstücks an das ambozeptorbeladene Blut dabei bereits im salzfreien Medium eingetreten ist oder erst bei dem Waschen in physiologischer Kochsalzlösung erfolgt. Einige Erfahrungen scheinen jedoch darauf hinzuweisen, daß unter Umständen eine wirkliche Bindung des Mittelstücks an ambozeptorbeladene Blutzellen im salzfreien Medium stattfinden kann.

9) Jedenfalls gelingt es konstant, durch geeignete Behandlung von ambozeptorbeladenem Blut mit Meerschweinchenserum in Rohrzuckerlösung „persensibilisiertes" Blut zu erhalten. Unter Umständen kann das einfache Sensibilisieren des „direkten" Rohrzuckerblutes bereits als Verfahren zur Herstellung persensibilisierten Blutes dienen.

10) Als Methode zur Gewinnung persensibilisierten Blutes empfiehlt es sich auch, sensibilisiertes Blut mit Meerschweinchenmittelstück, das 24 Stunden lang in Kochsalzlösung aufbewahrt war, zu behandeln.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Geheimen Obermedizinalrat Professor Dr. P. Ehrlich für die gütige Erlaubnis zur Ausführung vorliegender Untersuchungen, sowie Herrn Professor Dr. H. Sachs für die freundliche Anregung und Unterstützung meinen verbindlichsten Dank zu sagen.

Lebenslauf.

Verfasser dieser Arbeit, Hans Guggenheimer, israelitischer Religion, wurde am 3. Juli 1886 in Nürnberg als Sohn von Max und Elise Guggenheimer, geb. Hechinger, geboren. Sein † Vater war Kaufmann. Nach 3 Vorschulklassen in der Handelsschule zu Nürnberg trat er dort im Jahre 1895 in die Sexta des humanistischen neuen Gymnasiums ein und verließ es 1904 mit dem Zeugnis der Reife. Im Wintersemester 1904/05 ließ er sich zum ersten Mal an der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin immatrikulieren, im Sommersemester 1905 in München, im Wintersemester 1905/06 wieder in Berlin. Dort verblieb er dann während seines weiteren Studiums und bestand im Februar 1906 die ärztliche Vorprüfung, im Januar 1910 das ärztliche Staatsexamen. Seit 1. Februar 1910 ist er am Königl. Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. als Medizinalpraktikant tätig.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena. — 3826

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.